

# Method for producing undecane-1,11-bicarboxylic acid by microorganism fermenting synchronously

Patent Number : **CN1162644**

International patents classification : C12P-007/44 C12N-001/14

• **Abstract :**

CN1162644 A NOVELTY - A synchronous microbe fermentation process for producing undecane 1,11-dicarboxylic acid (DC13) with high output from n-tridecane (nC13), is new.

DETAILED DESCRIPTION - A synchronous microbe fermentation process for producing undecane 1,11-dicarboxylic acid (DC13) with high output from n-tridecane (nC13) features that after the mutational strain resultant from Candidatropicalis is inoculated to culture medium whose matrix is different normal alkanes containing C11-C18, its main action is to grow thallus within 28 hrs, generating a certain quantity of biatomic acid by controlling pH value under 6.8, then to generate acid while growing a certain amount of thallus in 28-60 hrs by controlling pH value under 7.3, and finally to quickly generate different biatomic acids after 60 hrs by controlling pH value to 7.5-7.8. When the process is used to produce DC13 by fermentation in 2.5 cu.m fermentator, the DC13 content is high up to 205 g/l in 161 hrs, the transform rate is 94% and the purity of DC13 is 96-97%. (Dwg.0/0)

• **Publication data :**

Patent Family : CN1162644 A 19971022 DW2003-58 C12P-

007/44 \* AP: 1997CN-0103876 19970404

Priority n° : 1997CN-0103876 19970404

Covered countries : 1

Publications count : 1

• **Patentee & Inventor(s) :**

Patent assignee : (MICR-) MICROORGAN INST CHINESE

ACAD SCI

Inventor(s) : CHEN Y; HAO X; PANG Y

• **Accession codes :**

Accession N° : 2003-608538 [58]

Sec. Acc. n° CPI : C2003-165961

• **Derwent codes :**

Manual code : CPI: D05-A04 D05-C09

E10-C02D2 E11-M

Derwent Classes : D16 E17

• **Update codes :**

Basic update code : 2003-58

• **Others :**

API Access. Nbr

API P200320466

UP4

2003-09



[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C12P 7/44

C12N 1/14 C12P 7/44

//C12R 1:74



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97103876.7

[43]公开日 1997年10月22日

[11] 公开号 CN 1162644A

[22]申请日 97.4.4

[71]申请人 中国科学院微生物研究所

地址 100080北京市中国科学院微生物研究所

[72]发明人 陈远童 庞月川 郝秀珍

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 微生物同步发酵正十三烷生产十一烷  
1,11 二羧酸方法

## [57]摘要

本发明公开了一种利用微生物同步发酵正十三烷 ( $nC_{13}$ ) 高产十一烷 1, 11-二羧酸 ( $DC_{13}$ ) 的方法。所用微生物为一株热带假丝酵母 (*Candidatropicalis*) 优良生产突变株 P-12-242。其特点是: 在微生物菌种接入含有  $C_{11}$ — $C_{18}$  各种正烷烃为基质的培养基后, 28 小时内, pH 控制在 6.8 以下, 以菌体生长为主, 产生一定数量二元酸; 28—60 小时, pH 控制在 7.3 以下, 以产酸为主, 增长一定量菌体; 60 小时以后 pH 控制在 7.5—7.8, 迅速生产各种二元酸。当本方法用于  $nC_{13}$  发酵生产  $DC_{13}$  时, 在  $2.5m^3$  发酵罐内, 161 小时,  $DC_{13}$  高达  $205g/L$ , 转化率达到 94%,  $DC_{13}$  的纯度达到 96—97%。

(BJ)第 1456 号

## 权利要求书

---

1. 一种利用微生物同步发酵正烷烃生产  $C_{11}$ — $C_{18}$  各种长链  $\alpha, \omega$ —二元酸的方法，其特征在于以正十三烷 ( $nC_{13}$ ) 为基质的培养基中，用热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) P-12-242，即 CGMCC NO. 0297 发酵，然后回收所形成的二元酸。
2. 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) P-12-242 即 CGMCC NO. 0297 菌株。

# 说明书

## 微生物同步发酵正十三烷生产十一烷 1,11-二羧酸方法

本发明涉及微生物同步发酵正烷烃生产长链  $\alpha, \omega$ -一二元酸的方法, 尤其是发酵正十三烷( $nC_{13}$ )高产十一烷 1, 11-二羧酸( $DC_{11}$ )的方法。

$C_{10}$ 以上的长链二元酸是化工上合成高级香料, 高级尼龙工程塑料, 高档服装用尼龙热熔胶, 高温电介质, 高级涂料, 润滑油添加剂和耐寒性增塑剂等的重要原料。尤其是十三碳二元酸( $DC_{13}$ )和十五碳二元酸( $DC_{15}$ ), 它们分别是合成日用香料麝香 T 和名贵香料麝香酮的重要原料。

$C_{10}$ 以上的长链二元酸, 在自然界中不单独存在, 只有少数几种二元酸可从植物油中裂介制取, 例如癸二酸( $DC_{10}$ )可从蓖麻籽油裂介制取;  $DC_{11}$ 可从菜籽油中抽提出甘油芥酸酯再用臭氧氧化方法生产;  $DC_{13}$ 可从蒜头果油中的脑神经酸裂介制取。但它们都受农田和气候的限制, 远不能满足需要。化工上至今也还没有经济可行的合成路线和方法。微生物学家应用生物工程技术, 利用微生物发酵石油中的正构烷烃生产相应链长的二元酸, 弥补了化工上的不足, 开辟了长链二元酸的新来源。

七十年代以前, 各国科学家对微生物发酵生产二元酸的研究, 只处于理论研究阶段, 所产生和积累的二元酸也都是十个碳以下的短链二元酸, 七十年代以后, 进入应用研究阶段, 通过大量的菌种诱变筛选, 培育出一批新突变菌株, 能从十个碳以上的正烷烃产生和积累与基质链长相同的长链二元酸, 并通过不断的培育和代谢调控研究, 使每升发酵液中二元酸的积累从开始时的几克, 十几克, 几十克提高到目前的一百多克和二百克左右。

八十年代以来, 二元酸的研究进入小规模工业生产阶段, 并出现了几个有实际生产价值的专利文献。中国专利 87105445.0, CN 1046757A, CN1092108A 和 CN 1130685A 分别提出生产长链  $\alpha, \omega$ -一二元酸的方法, 特别是分别高产  $DC_{16}$ ,  $DC_{17}$ ,  $DC_{15}$  和  $DC_{12}$  的方法。在 16 升自动控制罐中, 发酵 5 天,  $DC_{16}$  为 123g/L, 发酵 6 天,  $DC_{17}$  为 133g/L, 在 2.5m<sup>3</sup> 通用式发酵罐中, 发酵 6 天,  $DC_{15}$  为 178g/L, 在 3m<sup>3</sup> 发酵罐中, 发酵 5 天,  $DC_{12}$  为 145g/L。

对  $DC_{13}$  的研究, 日本矿业株式会社率先工业放大, 1984 年建成年产 200

吨的DC<sub>13</sub>的工业发酵装置,并投入生产。中国专利 CN 1071951A 提出一种微生物异步发酵生产长链  $\alpha, \omega$ -二元酸的方法,尤其是生产DC<sub>13</sub>的方法。其方法是分两步进行,根据实验例 4,第一步是把培养好的 600 升菌种液接入装有正十三烷(nC<sub>13</sub>)125 升和培养基 1775 升的 3m<sup>3</sup> 发酵罐内(即装液量为 83%),控制 PH 在4.5±0.1,繁殖培养菌体,24 小时,菌体浓度达到 8.7% (湿菌重);第二步;补加 20% (V/V) 的nC<sub>13</sub>,调 PH 至7.8±0.1,转入发酵产酸阶段,发酵 72 小时,DC<sub>13</sub>达到 98.2 g/L,继续发酵 72 小时,产酸达到 166.3g/L (从接种开始到发酵结束,共 168 小时),转化率为 84%。

本发明的目的是提出另一种利用微生物同步发酵正烷烃生产C<sub>11</sub>-C<sub>18</sub>长链  $\alpha, \omega$ -二元酸的方法,尤其是高产DC<sub>13</sub>的方法。

本发明所用的菌株为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) P-12-242,是以一株氧化正烷烃生产混合二羧酸的热带假丝酵母(参见《微生物学报》20 (1): 88—93, 1980) 为出发菌株,通过亚硝酸和紫外线的多次反复诱变筛选培育出来的,能从C<sub>11</sub>-C<sub>18</sub>的各种单一正烷烃和混合正烷烃,尤其是正十三烷,高产出地生产相应链长的二羧酸。热带假丝酵母 P-12-242 (以下简称 P-12-242)保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为: CGMCC NO. .

P-12-242 的生理特性如下:

- 一、糖类的发酵: 葡萄糖+, 半乳糖+, 蔗糖+, 麦芽糖+, 乳糖-。
  - 二、同化: 葡萄糖+, 半乳糖+, 山梨糖-, 蔗糖+, 麦芽糖+, 纤维二糖+, 海藻糖+, 乳糖-, 密二糖-, 棉子糖-, 松三糖+, 菊芋糖-, 可溶性淀粉+, 木糖+, L-阿戊糖+, D-阿戊糖-, 核糖-, 鼠李糖-,  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷+, 甘油+, 乙醇+, 赤藓醇-, 甘露醇+, 肌醇-, 核糠醇+, 半乳糖醇-, 葡萄糖醇+, 柠檬酸钠-, 丁二酸钠+, 乳酸钙-。
  - 三、生长素的需要: 生物素++, 维生素 B<sub>1</sub>++, 维生素 B<sub>2</sub>+, 维生素 B<sub>6</sub>+, 维生素 B<sub>12</sub>+, 叶酸+, 烟酸+, 泛酸+, 肌醇+, 对氨基苯甲酸+。
  - 四、其它: 硝酸盐-, 冻化牛奶-, 熊果酸分解-, 凝固牛奶-, 油脂酶-。
- 形态特征: 奶油白色, 皱褶型, 菌落为蛋糕状和桃酥状。
- 培养特征:

在麦芽汁液体培养基中培养时,假菌丝多而长;在烷烃种子培养基中

培养时,有一定数量的短假菌丝;而在发酵培养基中发酵时,大部分是单个椭圆细胞。

### 本发明的种子培养基:

- (1)、10个巴林糖度的麦芽汁加2%琼脂制成的固体斜面;
- (2)、10个巴林的麦芽汁液体培养基;
- (3)、烷烃种子培养基包含:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6—12g/L, 玉米浆 3—8g/L, 酵母膏 3—8 g/L, 蔗糖 3—8g/L, 尿素 3—6g/L, 重蜡 40—70ml/L, 自来水配制, 自然 PH。

培养种子的过程为:取一接种环 P—12—242 酵母菌体,涂布在麦芽汁固体斜面上(15×180 试管,每支装 6—7mL 培养基,放成斜面),于 28—30 °C 培养 40 小时。取一支上述培养好的 P—12—242 菌种分部刮入装有 25ml 烷烃种子培养基的 250mL 三角瓶中,于 28—30 °C 220 转/分的旋转摇床上培养 40—48 小时,作为摇瓶发酵种子或者取两支上述培养好的 P—12—242 菌种全部刮入装有 500mL 培养基的 5000ml 三角瓶中,于 180 转/分旋转摇床上 28—30 °C 培养 44—48 小时,作为一级种子罐的种子。

用本发明的 P—12—242 菌株生产长链二羧酸,特别是十三碳二羧酸的具体方法是:把发酵的种子接入 PH5.5—9.0,最好为 6.5—7.5 的含有 15—45% (V/V) 的  $\text{C}_{11}$ — $\text{C}_{18}$  的正烷烃和 85—55% (V/V) 发酵培养基的混合液中。发酵培养基的组成为:碱金属磷酸盐 6—14g/L,最好为 7—10g/L,氯化钠 0.5—2.0g/L、酵母膏 1—6g/L,最好为 3—5g/L,玉米浆 0.5—2g/L,尿素 0.5—2.5g/L 最好为 1.0—2.0g/L,硝酸盐 5—15g/L,最好为 6—12g/L,蔗糖 10—30g/L,最好为 10—20g/L,消泡剂 400—1200ppm 以及一些其他公知的营养源,在 PH5.8—7.5 之间将上述混合物在 25—30 °C,最好在 27—31 °C 通气发酵 48—170 小时。28 小时内,PH 控制在 6.8 以下,以菌体生长为主,产酸为付,此时菌株生长光密度 OD 达到 0.6 左右,产酸达到 20—30g/L,在 28—60 小时,PH 控制在 7.3 以下,产酸为主,菌体生长为付,此时 OD 达至 0.9 左右,产酸达到 75—85g/L,从 60 小时以后,每隔 6—8 小时用  $\text{NaOH}$  溶液调一次 PH 至 7.5—8.0,菌体量不再增加,而产酸量继续迅速增加,然后将产生的二羧酸从发酵液中分离出来。在发酵开始时,混合液中正烷烃含量为 10—20% (V/V),以后在适当时间补加正烷烃,使发酵液中正烷烃浓度始终 >5% (V/V) 为准。碱金属磷酸盐可从  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{N}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{N}_2\text{HPO}_4$  中选一种。硝酸盐可从钾或钠盐中选一种。

发酵结束后，加入适量的水，加碱至 PH10—12，加热至 85—90°C，进行破乳分层，上层为残油，回收再用，放出中间清液，下层菌体层再处理一次或压滤或离心，合并清液，加入适量活性炭，在 85—90°C，脱色 30 分钟，除去活性炭后，脱色液加热至 60—70°C，加 HCl 或 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至 PH4—5 进行酸化结晶，冷却至 30°C 后，压滤，用空气吹干，60°C 烘干，得白色十三碳二羧酸结晶。

用本发明的 P—12—242 菌株和发酵方法，可生产 C<sub>11</sub>—C<sub>18</sub> 的各种单一和混合二羧酸。其中在 2.5 吨罐上，从正十三烷发酵生产十三碳二羧酸，发酵 6 天，产酸量高达 180—200g/L，后处理总收率达到 80%，纯度达到 96% 以上。

### 实例一

- (1)、取一接种环 P—12—242 菌种，涂布在 15×180 大试管麦芽汁固体斜面上，30 °C 培养两天。
- (2)、取上述菌种一支，接入装有 25ml 烷烃种子培养基的 250ml 三角瓶中于 30 °C 在 220 转/分的旋转摇床上培养 48 小时。烷烃种子培养基中 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8g/L，酵母膏 5g/L，玉米浆 3g/L，蔗糖 5g/L，尿素 3g/L，重蜡 50ml/L，自来水配制，PH5.0。
- (3)、在装有 15ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中，接入 3.5ml 上述种子液，在 200 转/分旋转摇床上发酵 4 天，每 24 小时用 N<sub>2</sub>OH 调一次 PH 至 7.5—8.0。发酵培养基含 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8g/L，酵母膏 2g/L，玉米浆 1g/L，氯化钠 1.5g/L，尿素 1g/L，正十三烷 200ml/L，泡敌 500ppm，KNO<sub>3</sub> 7g/L，自来水配制，PH7.5，在 110°C 下灭菌 30 分钟。发酵结束后用 HCl 调 PH 至 3，用 100ml 乙醚提取，除去乙醚，得白色结晶，用标准 N<sub>2</sub>OH 溶液滴定，计算二羧酸含量。结果 DC<sub>12</sub> 产量为 85.2g/L，经气相色谱分析，DC<sub>12</sub> 纯度为 97.46%。

### 实例 2

按照实例 1 的方法，只是正烷烃用 nC<sub>15</sub>，结果 DC<sub>15</sub> 的产量为 53.6g/L，纯度为 96.81%。

### 实例 3

按照实例 1 的方法，只是正烷烃用 nC<sub>17</sub>，结果 DC<sub>17</sub> 的产量为 52.0 g/L，纯



度为 97.2%。

#### 实例 4

种子培养基和培养方法同实例 1，发酵培养基为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8g/L， $\text{N}_2\text{Cl}$  1g/L，酵母膏 2g/L，玉米浆 1g/L， $\text{KNO}_3$  7g/L，蔗糖 15g/L，泡敌 600ppm，尿素 1.8g/L，正十三烷 200ml/L，自来水配制，PH 7.5，发酵 4 天， $\text{DC}_{13}$  产量为 86.06g/L， $\text{DC}_{13}$  纯度 93.3%。

#### 实例 5

种子培养基和培养方法同实例一，发酵培养基同实例 4。把培养两天，经镜检无杂菌的 400LP—12—242 种液接入装有 1500L 发酵培养基，其中  $\text{nC}_{13}$  300L 经 121°C 灭菌 40 分钟的 2500L 发酵罐中，29°C，200 转/分，罐压 0.8Kg/cm<sup>2</sup>，通气量 1 : 0.8，28 小时以前，PH 控制在 6.8 以下，28—60 小时，PH 控制在 7.3 以下，60 小时后每隔 8—6 小时，用  $\text{N}_2\text{OH}$  溶液调一次 PH 至 7.5，从第三天开始，每天补加正十三烷 120L，共 3 次，发酵 6 天多（161 小时），发酵清液中十三碳二羧酸含量为 205g/L。发酵结束后，加入 300L 自来水，加热至 80°C，加碱调 PH 至 11，冷却降温至 50°C，放入分层罐中静置分层一天，放出上层残油，回收使用，下层菌层通过压滤，除去菌体，滤清液与中层清液合并，加入 0.7% 活性炭，90 °C 脱色 15 分钟，压滤除去活性炭，脱色滤清液打入酸化罐中，加水至  $\text{DC}_{13}$  浓度为 4%，加热至 70 °C，加入浓 HCl 酸化至 PH 3，冷却降温至 30°C 左右，板框压滤，空气吹干，固形物在 60°C 烘干，得白色  $\text{DC}_{13}$  249 Kg，转化率 94.0%，纯度为 96.7%。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**